

การวิเคราะห์ปริมาณคลอซอกซาโซนและพาราเซตามอลในเภสัชตำรับ
ด้วยแถบขอบชั้นสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยการใช้การสอบเทียบชนิดตัวแปรหลายตัวแปร
แบบตัวประกอบสำคัญและกำลังสองน้อยที่สุดแบ่งส่วน



เรืออากาศโทหญิงวรกัญ ประเสริฐศักดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเภสัชเคมี ภาควิชาเภสัชเคมี


คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1655-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CHLORZOXAZONE AND PARACETAMOL
IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY ABSORPTION
SPECTROPHOTOMETRY USING PRINCIPAL COMPONENTS
AND PARTIAL LEAST-SQUARES MULTIVARIATE CALIBRATION



Flying officer Woragott Prasertsak

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Pharmaceutical Chemistry

Department of Pharmaceutical Chemistry

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic year 2004

ISBN 975-53-1655-5


Thesis Title SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CHLORZOXAZONE AND
PARACETAMOL IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY
ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY USING PRINCIPAL
COMPONENTS AND PARTIAL LEAST-SQUARES
MULTIVARIATE CALIBRATION

By Flying officer Woragott Prasertsak

Field of study Pharmaceutical Chemistry


Thesis Advisor Walapa Tatong, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree


..... Dean of the Faculty Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Darawan Tanyavutti)


..... Thesis Advisor
(Walapa Tatong, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong)


..... Member
(Associate Professor Duangchit Panomvan Na Ayudhya, Ph.D.)

วรกฎ ประเสริฐศักดิ์ : การวิเคราะห์ปริมาณคลอซอกซาโซนและพาราเซตามอลในเภสัช
ตำรับด้วยแอบซอร์ปชันสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยการใช้การสอบเทียบชนิดตัวแปรหลายตัว
แปรแบบตัวประกอบสำคัญและกำลังสองน้อยที่สุดแบ่งส่วน


(SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CHLORZOAZONE AND
PARACETAMOL IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY ABSORPTION
SPECTROPHOTOMETRY USING PRINCIPAL COMPONENTS AND PARTIAL
LEAST-SQUARES MULTIVARIATE CALIBRATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ดร. วัลลภา
ทาทอง 83 หน้า. ISBN 974-53-1655-5

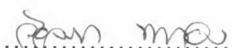
การวิเคราะห์การถดถอยโดยใช้ตัวประกอบสำคัญ และการวิเคราะห์การถดถอยโดยใช้ตัวประกอบ
กำลังสองน้อยที่สุดแบ่งส่วน ซึ่งเป็นวิธีการทางเคมีเมตริก 2 วิธี ถูกนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคลอ
ซอกซาโซน และพาราเซตามอลในยาเม็ดจากการวิเคราะห์ในครั้งเดียวกัน โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกตัวยา
สำคัญ สารละลายเมธานอลซึ่งประกอบด้วยตัวยาทั้งสองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จำนวน 26 ตัวอย่างถูก
เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับการสอบเทียบ โดยนำสารละลายเหล่านี้ไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 26 ความยาวคลื่น
(เริ่มจาก 220 นาโนเมตร จนถึง 350 นาโนเมตร) ที่ทุก 5 นาโนเมตร ตลอดช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 200 ถึง
400 นาโนเมตร ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีการสอบเทียบที่ได้พัฒนาขึ้น โดยทดสอบกับสารละลาย
จำนวน 6 ตัวอย่างที่มีตัวยาทั้งสองชนิดผสมอยู่ การคำนวณค่าต่าง ๆ คำนวณโดยใช้โปรแกรมมินิแทบ
การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กับตัวอย่างยาเม็ดผสมที่เตรียมขึ้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์การ
ถดถอยโดยใช้ตัวประกอบสำคัญ และการวิเคราะห์การถดถอยโดยใช้ตัวประกอบกำลังสองน้อยที่สุดแบ่งส่วน
สำหรับตัวยาคลอซอกซาโซนพบว่ามีค่าเฉลี่ยของการคืนกลับและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็น
 106.8 ± 1.4 and 106.2 ± 1.8 และสำหรับพาราเซตามอลพบว่ามีค่าเฉลี่ยของการคืนกลับและส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์เป็น 102.1 ± 1.0 and 101.9 ± 1.0 สามารถนำวิธีการสอบเทียบที่พัฒนาขึ้นนี้ไปวิเคราะห์
ปริมาณตัวยาทั้งสองในตัวอย่างยาเม็ดผสมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ได้เป็นผลสำเร็จ วิธีวิเคราะห์ทั้งสองที่ได้
จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคลอซอกซาโซน และพาราเซตามอลในตำรับยา
ผสมได้เป็นที่น่าพอใจ

ภาควิชา.....เภสัชเคมี.....

สาขาวิชา.....เภสัชเคมี.....

ปีการศึกษา.....2547.....

ลายมือชื่อนิสิต..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4576594633 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

KEY WORD : ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY / PRINCIPAL

COMPONENT REGRESSION / PARTIAL LEAST-SQUARES / CHLORZOAZONE /
PARACETAMOL

WORAGOTT PRASERTSAK : SIMULTANEOUS DETERMINATION OF

CHLORZOAZONE AND PARACETAMOL IN PHARMACEUTICAL

PREPARATIONS BY ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY USING

PRINCIPAL COMPONENTS AND PARTIAL LEAST-SQUARES MULTIVARIATE

CALIBRATION. THESIS ADVISOR: WALAPA TATONG, Ph. D., 83 pp. ISBN 974-

53-1655-5

The simultaneous determination of chlorzoxazone and paracetamol in pharmaceutical preparation are simple and rapid method by principal component regression (PCR) and partial least-squares (PLS) regression were performed. In this study both of PCR and PLS are successfully applied to quantify both drugs using the information obtained from ultraviolet absorption spectra of appropriate solutions. The concentration ranges used to construct the calibration set were varied between 3.7185-18.5925 and 4.6650-23.3250 $\mu\text{g/ml}$ for chlorzoxazone and paracetamol, respectively. The absorbances were measured in the wavelength range of 270-295 nm (2 principal components) for chlorzoxazone using PCR and PLS and 230-270 nm (3 principal components), 230-350 nm (2 principal components) for paracetamol using PCR, and PLS respectively. The methods were validated and linearity was found in range 1-50 $\mu\text{g/ml}$ (chlorzoxazone) and 0-30 $\mu\text{g/ml}$ (paracetamol) with good accuracy and precision, not more than 2 % RSD and the percentage of average recovery of both drugs using both methods were nonstatistically significant. Applying two algorithms to the calibration set, the calibration data were modeled and results were applied to two different commercial tablets containing chlorzoxazone and paracetamol were analyzed. The results obtained from application of two methods were satisfactory. The studied methods were proved to be suitable for determination of the two drugs in tablets without extraction. Thus, the developed method can be applied successfully in quantitative analysis of other pharmaceutical preparations in the market.

Department.....Pharmaceutical chemistry...

Student's signature.....*Woragott Prasertsak*.....

Field of study....Pharmaceutical chemistry...

Advisor's signature.....*Walapa Tatong*.....

Academic year2004.....

Co- advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

My sincere gratitude is expressed to my advisor, Dr. Walapa Tatong, for, particularly, to lighten me how the sequence of study and thought are, and for inestimable advice, attentive, generosity, continual guidance, understanding, kindness and encouragement throughout the period of my graduate study.

I would like to express my thankfulness to Associate Professor Darawan Tanyavutti, Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong and Associate Professor Dr. Duangchit Panomvan nayudhaya for serving as my thesis committee.

I would like to thank Dy-mach Pharma and Siam Pharmaceutical Co., Ltd. for their kindness support chlorzoxazone in this study.

Thankful expression is also extended to all staffs of the Department of Pharmaceutical Chemistry for their cooperation and helpfulness.

A special appreciation is given to the Graduate School of Chulalongkorn University.

I have been also appreciated every member of Laboratory of Pharmaceutical Chemistry helpfulness throughout my graduate study.

Finally, I would like to express my deeply gratitude to my beloved parents, my grandparents and my sister for their endless love, understanding, supporting, encouragement and so on throughout my whole life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGTURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
III EXPERIMENTS.....	21
1. Determination of the spectrophotometric condition.....	22
2. Establishment of calibration models.....	23
3. Method validation.....	25
4. Assay of commercial tablets	27
5. TLC of degradation compounds of chlorzoxazone and paracetamol.....	27
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	30
V CONCLUSION.....	75
REFERENCES.....	77
VITAE.....	83

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Summary of Some Popular Multivariate Calibration Methods	6
2. Compositions and concentrations of the calibration set.....	23
3. Compositions and concentrations of the validation set	24
4. Concentrations and absorbances of chlorzoxazone at 283 nm.....	32
5. Concentrations and absorbances of paracetamol at 248 nm.....	33
6. Compositions and concentrations of the calibration set.....	35
7. Regression standardize coefficients of chlorzoxazone and paracetamol ..	39
8. Model selection and Validation in the PLSR model.....	41
9. Eigenanalysis of the chlorzoxazone and paracetamol in the PCR model ..	44
10. Statistical parameter of cross-validation for PCR and PLSR from spectral data of calibration set	46
11. X score value of chlorzoxazone and paracetamol from the PCR model.....	47
12. X score value of chlorzoxazone and paracetamol from the PLS model.....	49
13. X loading value of chlorzoxazone and paracetamol from the PCR model....	52
14. X loading value of chlorzoxazone and paracetamol from the PLS model.....	54
15. Statistic parameter of chlorzoxazone and paracetamol using the PCR and PLSR quantitation of nine mixtures on the validation set.....	56
16. Accuracy data for chlorzoxazone using in the PCR and PLSR models.....	57
17. Accuracy data for chlorzoxazone using in the PCR and PLSR models.....	57
18. Within-run and between-run precisions of chlorzoxazone in spiked synthetic standard mixtures (placebo) using the PCR and PLSR models	58
19. Within-run and between-run precision of paracetamol in spiked synthetic standard mixtures (placebo) using the PCR and PLSR models.....	59
20. Assay results for chlorzoxazone and paracetamol of product A and B using the PCR and PLSR models	62

Table	Page
21. Mean recovery of chlorzoxazone and paracetamol in spiked synthetic standard mixtures (placebo).....	63
22. Effect of photolysis on standard mixture solution and product (chlorzoxazone: paracetamol = 12.5: 15 µg/ml).....	71



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Chemical structures of chlorzoxaxone (I) and paracetamol (II)	2
2.	Illustration of why spectroscopy and chemometrics work well in conjunction	6
3.	Illustration of the terms objects, observations and experiments, variables, factors and responses	8
4.	Data pretreatment	9
5.	Schematic description of the calibration set and validation set used in multivariate calibration.....	10
6.	Geometrical interpretation of a PCA model consisting of one PC	13
7.	Schematic description of a decomposition of a matrix X with PCA using two PCs.....	14
8.	Geometrical interpretation of a PLS model consisting of one PLS component...	16
9.	Schematic description of the matrices in PLS regression.....	17
10.	Mixture design for the two-component mixtures used in the calibration set (●) and the validation set (■).....	24
11.	UV absorption spectra of chlorzoxazone, paracetamol and their mixture in methanol.....	30
12.	UV absorption spectra of standard mixture solution of chlorzoxazone and paracetamol and sample solution of the commercially tablets (Cezox®), containing the same concentration of chlorzoxazone and paracetamol in methanol.....	31
13.	UV absorption spectra of standard mixture solution of chlorzoxazone and paracetamol and sample solution of the commercially tablets (Parafon-forte®), containing the same concentration of chlorzoxazone and paracetamol in methanol.....	31

Figure	Page
14. Absorbance values at 283 nm versus the concentrations (1-50 $\mu\text{g/ml}$) of standard solution of chlorzoxazone.....	33
15. Absorbance values at 248 nm versus the concentrations (0.48-30 $\mu\text{g/ml}$) of standard solution of paracetamol.....	34
16. UV absorption spectra of the placebo in methanol.....	36
17. UV absorption spectra of standard solution of chlorzoxazone and plus the placebo in methanol.....	36
18. UV absorption spectra of standard solution paracetamol and plus the placebo in methanol.....	37
19. UV absorption spectra of standard mixture solution of chlorzoxazone and paracetamol and their mixture plus the placebo in methanol.....	37
20. PLS Standard Coefficient Plot for chlorzoxazone using the wavelength region 220-350 nm.....	38
21. PLS Standard Coefficient Plot for paracetamol using the wavelength region 220-350 nm.....	40
22. The screen plot expressing the relation between the eigenvalue and the component numbers for chlorzoxazone using the wavelength region 220-350 nm.....	42
23. Scatter plot of R-sq (●) and R-sq(pred) (■) versus PCs of chlorzoxazone with studied wavelength range of 270-295 nm	42
24. Scatter plot of R-sq (●) and R-sq(pred) (■) versus PCs of paracetamol with studied wavelength range of 230-270 nm.....	43
25. Plot of PRESS against PCs for paracetamol with studied wavelength range of 230-270 nm	43
26. The scree plot expressing the relation between the eigenvalue and the component numbers for chlorzoxazone using the wavelength region 220-350 nm	45

Figure	Page
27. The scree plot expressing the relation between the eigenvalue and the component numbers for paracetamol using the wavelength region 220-350 nm.....	45
28. PCR Score plot of chlorzoxazone using the wavelength range of 270-295 nm with 2 PCs	48
29. PCR Score plot paracetamol using the wavelength range of 230-350 nm with 2 PCs	48
30. PLSR Score plot of chlorzoxazone using the wavelength range of 270-295 nm with 2 PCs	50
31. PLSR Score plot paracetamol using the wavelength range of 230-270 nm with 3 PCs	50
32. PCR Loading plot of chlorzoxazone using the wavelength range of 270-295 nm with 2 PCs	53
33. PCR Loading plot paracetamol using the wavelength range of 230-350 nm with 2 PCs	53
34. PLSR Loading plot of chlorzoxazone using the wavelength range of 270-295 nm and with 2 PC.....	54
35. PLSR Loading plot paracetamol using the wavelength range of 230-270 nm with 3 PCs.....	55
36. Linear regression line of the amount added (in $\mu\text{g/ml}$) versus the amount found (in $\mu\text{g/ml}$) of chlorzoxazone in the PCR model.....	60
37. Linear regression line of the amount added (in $\mu\text{g/ml}$) versus the amount found (in $\mu\text{g/ml}$) of chlorzoxazone in the PLS model.....	60
38. Linear regression line of the amount added (in $\mu\text{g/ml}$) versus the amount found (in $\mu\text{g/ml}$) of paracetamol in the PCR model.....	61
39. Linear regression line of the amount added (in $\mu\text{g/ml}$) versus the amount found (in $\mu\text{g/ml}$) of paracetamol in the PLS model.....	61

Figure	Page
40. TLC of methanolic solution 0.35 mm, 3 x 7 cm Silica gel GF ₂₅₄ plates with iodine detection	65
41. TLC of hydrolysis of standard mixture solution on 0.35 mm, 3 x 7 cm Silica Gel GF ₂₅₄ plates with iodine detection	66
42. TLC of hydrolysis of product on 0.35 mm, 3 x 7 cm Silica gel GF ₂₅₄ plates with iodine detection	67
43. TLC of hydrolysis of the placebo on 0.35 mm, 3 x 7 cm Silica gel GF ₂₅₄ plates with iodine detection	68
44. TLC of oxidation on standard mixture solution, product and the placebo degradation on 0.35 mm, 3 x 7 cm Silica gel GF ₂₅₄ plates with iodine detection	69
45. Estimated mean average of the percentage recovery of chlorzoxazone in standard mixture solutions and commercial tablets	72
46. Estimated mean average of the percentage recovery of paracetamol in standard mixture solutions and commercial tablets	72
47. Comparison of UV absorption spectra of standard mixture solutions, after four weeks of storing in the dark and exposing to daylight.....	73
48. Comparison of UV absorption spectra of commercial tablets, after four weeks of storing in the dark and exposing to daylight	73
49. Comparison of UV absorption spectra of placebo, after four weeks of storing in the dark and exposing to daylight	74

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percent
Σ	sum
μg	microgram
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
CLS	classical least square
CV	cross validation
cm	centimeter
conc	concentration
Eqn.	equation
g	gram
hr	hour
LA	labeled amount
ILS	inverse least square
LOO	leave-one-out
MLR	multiple linear regression
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
N	normality
NIPALS	nonlinear iterative partial least squares
No.	number
nm	nanometer
PCA	principle component analysis
PCR	principle component regression
PCs	principle components
PLS	partial least squares
PLSR	partial least squares regression
PRESS	prediction error of sum of squares

R^2	coefficient of determination
RSD	relative standard deviation
r	correlation coefficient
SD	standard deviation
TLC	thin layer chromatography
UV	ultraviolet
vol.	Volume



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย